



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 14 622 T2 2004.02.26

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 981 644 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 14 622.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/00961

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 903 558.9

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/033940

(86) PCT-Anmeldetag: 21.01.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 06.08.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 01.03.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 14.05.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 26.02.2004

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: C12Q 1/68

G01N 33/574

(30) Unionspriorität:

791883 31.01.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

The Johns Hopkins University, Baltimore, Md., US

(72) Erfinder:

LAKEN, Steve, Baltimore, US; GRUBER, Stephen,  
Ann Arbor, US; PETERSEN, Gloria, Glen Arm, US;  
KINZLER, Kenneth, Belair, US; VOGELSTEIN,  
Bert, Baltimore, US

(74) Vertreter:

WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,  
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising

(54) Bezeichnung: EINE APC-MUTATION, DIE MIT FAMILIÄREM DICKDARMKREBS BEI ASHKENAZI-JUDEN EINHERGEHT

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

### Beschreibung

[0001] Die Regierung der Vereinigten Staaten von Amerika behält gewisse Rechte an der Erfindung, da sie die Erfinder im Rahmen der NIH-Finanzhilfen CA 43460 und CA 62924 unterstützte.

### TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

[0002] Diese Erfindung betrifft die Erkennung eines Gens, welches Träger für Kolorektalkrebs prädisponiert.

### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Von den 160.000 neuen<sup>o</sup> Fällen von Kolorektalkrebs (CRC), die jedes Jahr in den Vereinigten Staaten diagnostiziert werden, haben wenistens 15% eine Vererbungskomponente. Zwei gut definierte Syndrome, familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und erblicher nicht-polypöser Kolorektalkrebs (HNPCC) sind für bis zu 5% der familiären Fälle verantwortlich. Trunkierende APC-Mutationen sind für FAP verantwortlich, und defekte Mismatch-Repair-Gene verursachen HNPCC. Jedoch sind die Gene, die für die Mehrzahl der familiären Fälle verantwortlich sind, unbekannt. Es gibt einen Bedarf in der Technik für zusätzliche Hilfsmittel und Information zum Identifizieren von familiären Krebsgenen.

### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0004] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine allel-spezifische Nukleinsäuresonde zur Verfügung zu stellen.

[0005] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Verfahren zum Bestimmen der Gegenwart einer Mutation in einem APC-Gen zur Verfügung zu stellen.

[0006] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Kit zur Verfügung zu stellen, welches für die Bestimmung einer Mutation in einem APC-Gen nützlich ist.

[0007] Diese und andere Aufgaben der Erfindung werden gelöst durch das Zurverfügungstellen einer allel-spezifischen Nukleinsäuresonde, welche die Nukleinsäuresequenz einer Region einer humanen APC-Mutante oder dessen Ribonukleotidäquivalent umfaßt, wobei der Bereich eine T nach A Transversion bei Nukleotid 3920 enthält.

[0008] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zum Bestimmen des Vorliegens einer Mutation im APC in einem Probanden, welche mit einer Familiengeschichte von Kolorektalkrebs unter Ashkenazi-Juden in Verbindung steht, zur Verfügung gestellt. Das Verfahren umfaßt den Schritt:

[0009] Bestimmen des Vorliegens einer T nach A Transversionsmutation bei Nukleotid 3920 in einem APC-Gen eines Probanden.

[0010] Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein anderes Verfahren zur Verfügung gestellt, zum Bestimmen der Gegenwart einer Mutation im APC in einem Probanden, welche mit einer Familiengeschichte von Kolorektalkrebs unter Ashkenazi-Juden in Verbindung steht. Das Verfahren umfaßt den Schritt:

[0011] Bestimmen der Gegenwart eines Lysins bei Aminosäure 1307 des APC-Proteins des Probanden.

[0012] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein drittes Verfahren zur Verfügung gestellt, zum Bestimmen der Gegenwart einer Mutation im APC in einem Probanden, welche mit einer Familiengeschichte von Kolorektalkrebs unter Ashkenazi-Juden in Verbindung steht. Das Verfahren umfaßt den Schritt:

[0013] Bestimmen der Gegenwart eines Lysin-Codons bei Codon 1307 eines APC-Gens eines Probanden.

[0014] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Kit zur Verfügung gestellt, zum Bestimmen einer Mutation im APC, welches Träger für Kolorektalkrebs prädisponiert. Das Kit umfaßt:

ein Paar Oligonukleotidprimer zum Amplifizieren von wenigstens einem Teil des APC-Exon 15, welches Nukleotid 3920 umfaßt; und

eine allel-spezifische Sonde, welche die Nukleinsäuresequenz einer Region einer humanen APC-Mutante oder dessen Ribonukleotidäquivalent umfaßt, wobei die Region eine A nach T Transversion bei Nukleotid 3920 enthält.

[0015] Diese und andere Ausführungsformen der Erfindung, welche dem Fachmann nach dem Lesen dieser Offenbarung klar sein werden, stellen der Technik Hilfsmittel und Verfahren zum schnellen und leichten Detektieren von einem bestimmten Allel, welches mit familiärem Kolorektalkrebs in Verbindung steht, zur Verfügung.

### KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0016] **Fig. 1** IVSP-Assays von APC-Codons 1099 bis 1693.

[0017] **Fig. 1a.** Mit "N" markierte Spuren enthalten Polypeptide von Patienten ohne die I1307K-Mutation und die Spur "M" enthält Polypeptide vom Index-Patienten, der für die I1307K-Mutation heterozygot ist. Der Pfeil

zeigt auf das Duplet der trunkierten Polypeptide, die in dem Patienten mit der Mutation vorhanden sind. Der Grund für das Duplet an der angezeigten Position ist nicht klar, aber könnte zwei unabhängige Slippage-Events in dem (A)<sub>8</sub>-Bereich repräsentieren.

[0018] **Fig. 1b.** Sequenz von PCR-Produkten des IndexPatienten. Die Wild-Typ-Sequenz ist AAA ATA AAA und die Mutantensequenz ist AAA AAA AAA, von der vorausgesagt wird, daß sie ein Isoleucin an Codon 1307 durch ein Lysin ersetzt. Der Pfeil zeigt auf den heterozygoten Mutationsort.

[0019] **Fig. 2** Stammbäume der Probanden mit der I1307K-Mutation. Patienten, die von CRC betroffen sind, sind durch ausgefüllte Symbole bezeichnet, Patienten mit Polypen sind durch schattierte Kästen bezeichnet und Patienten mit anderen Krebsarten sind durch Kreuze bezeichnet. Krebsarten und Alter bei der Diagnose sind angezeigt, wenn sie bekannt sind. Individuen mit der I1307K-Mutation sind als "+" bezeichnet, und Individuen, die für diese Mutation getestet wurden, aber wo gefunden wurde daß sie diese nicht tragen, sind mit.. „ „ bezeichnet.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0020] Es ist eine Entdeckung der vorliegenden Erfinder, daß eine bestimmte Mißsense-Mutation in dem APC-Gen in der Ashkenazi-Judenbevölkerung vorherrschend ist. Diese Mutation steht mit familiärem Kolorektalkrebs in Verbindung. Zusätzlich scheint sie mit einem unterschiedlichen Satz Symptomen in Verbindung zu stehen, verschieden von denen, die durch die gut bekannten trunkierenden Mutationen im APC verursacht werden. Eher als Tausende von Polypen zu verursachen, wie oft in typischen FAP-Patienten gefunden wird, scheint diese Mutation eine "abgemilderte Polyposis" zu verursachen, d.h. eine viel geringere Häufigkeit der Polypen.

[0021] Diese Mutation verursacht eine Isoleucin nach Lysin Substitution bei Aminosäure 1307 des APC. Es wurde gefunden, daß dies durch eine T nach A Transversionsmutation bei Nukleotid 3920 verursacht wird. Allel-spezifische Oligonukleotide, die einen Teil des APC-Gens enthalten, der diese Mutation enthält, können verwendet werden, um diejenigen zu erkennen, welche die Mutation tragen, in der Bevölkerung im allgemeinen oder in der Ashkenazi-Bevölkerung oder in Familien, die Kolorektalkrebs in der Ashkenazi-Bevölkerung haben. Die Oligonukleotide können als Sonden für die Hybridisierung verwendet werden. Sie können als Primer, z. B. für allel-spezifische PCR, verwendet werden. Sie können auch verwendet werden, um immunogene Polypeptide oder Fusionsproteine für die Verwendung bei der Herstellung von spezifischen Antikörpern, welche das mutante Epitop erkennen, herzustellen.

[0022] Um zu bestimmen, ob ein bestimmtes Individuum (ein Proband) diese Mutation hat, können entweder seine DNA, RNA oder Proteine auf Hinweise für die Mutation untersucht werden. Wenn die Nukleinsäuren untersucht werden, würde man die Gegenwart einer Mutation nachprüfen, die ein Lysin bei Aminosäure 1307 verursacht. Wenn Proteine untersucht werden, könnte die Gegenwart eines Lysins direkt in den Proteinen durch Sequenzieren oder durch Verwendung von spezifischen immunologischen Reagenzien, so wie monoklonale Antikörper oder monospezifische polyklonale Antikörper, welche das mutante Epitop erkennen, aber nicht die Wildtyp-Form des APC-Proteins, bestimmt werden. Auf ähnliche Art und Weise können Nukleinsäuren sequenziert werden, um die Gegenwart einer Mutation zu bestimmen. Jegliche einzelne oder Kombination der Techniken kann zur Bestimmung von Mutationen verwendet werden. Beispielsweise RNA kann revers transkribiert werden und in vitro exprimiert werden, und das in vitro synthetisierte Protein kann mit jeglichen Mitteln, die im Stand der Technik bekannt sind, analysiert werden. Alternativ kann RNA revers transkribiert zu DNA werden, die DNA kann unter Verwendung von PCR amplifiziert werden, und die PCR-Produkte können mit einer allel-spezifischen Sonde geprüft werden.

[0023] Ein Kit, das für die Verwendung solch einer Technik nützlich ist, wird ebenso zur Verfügung gestellt. Es enthält Primer zum Amplifizieren von Exon 15 (insgesamt oder wenigstens den Teil, der Codon 1307 enthält) ebenso wie eine allel-spezifische Sonde gemäß der Erfindung. Andere optionale Bestandteile des Kits beinhalten schriftliche Anweisungen, eine DNA-Polymerase zum Ausführen der PCR, Puffer, Sonden für das Detektieren anderer Mutationen im APC, reverse Transkriptase, Reaktionsgefäß, Membranen für Hybridisierungen.

[0024] Der Nachweis, daß die I1307K-Mutation krankheitsverursachend ist, ist dreifach. Erstens tritt die Mutation in einem "gate-keeping"-Gen auf, das kritisch für die Unterdrückung der Initiierung des neoplastischen Prozesses ist, und in einem Bereich des APC's, von dem gedacht wird, daß er essentiell für dessen ordentliche Funktion ist, auf. Zweitens ist die Frequenz der Mutation deutlich höher in Index-Fällen der familiären kolorektalen Krebspatienten, als in der allgemeinen Ashkenazi-Bevölkerung. Und drittens wurde innerhalb solcher Familien die Mutation in allen bis auf elf Patienten mit kolorektaler Neoplasia gefunden. Diese Mutation überträgt sicherlich nicht die tausenden Polypen, die bei den typischen FAP-Patienten mit trunkierenden Mutationen im mittleren Drittel des APCcodierenden Bereiches gefunden werden. Der Phänotyp erinnert eher an den der Patienten mit "abgemilderter Polyposis" aufgrund der trunkierenden Mutationen am Amino-Terminus von APC. Es wird faszinierend sein, in größeren zukünftigen Studien zu bestimmen, ob die Gegenwart von I1307K aus-

reichend ist, um eine CRC-Prädisposition zu übertragen, oder ob andere genetische oder Umwelt-Faktoren mit I1307K zusammentreffen, um solch eine Prädisposition zu verursachen.

[0025] Diese Ergebnisse haben daher wesentliche Implikationen für die Prädisposition für Kolorektalkrebs in der Ashkenazi-Bevölkerung. Frühere Studien haben demonstriert, daß andere Mutationen, einschließlich derer, die für Brustkrebs prädisponieren, in höherer Häufigkeit in dieser Bevölkerung gefunden werden kann, auch wenn nicht so gewöhnlich, wie I1307K (Nature Medicine 2(11)1179–1183) (Cancer Research 56(15) 3409-3414). Bis jetzt sollten unsere Ergebnisse nicht zu einem generellen Screening der Ashkenazis im Hinblick auf I1307K auffordern, da das relative Risiko des Krebses, das mit dieser Mutation in Verbindung steht, in der Abwesenheit einer CRC-Familiengeschichte noch nicht etabliert wurde. Jedoch in Familien, in denen zwei oder mehrere Individuen CR Neoplasia haben, suggerieren unsere Ergebnisse, daß Individuen mit I1307K einem hohen Kolorektalkrebsrisiko ausgesetzt sind (wenigstens 30% Lebenszeitrisiko, den Stamm bäumen, die in **Fig. 2** gezeigt sind und konservativen Annahmen nach zu urteilen). Da effektive Maßnahmen zum Limitieren der CRC-Sterblichkeit durch das genetische Testen in angemessen ausgewählten Familien erhältlich sind, scheint eine weitere Bewertung dieses Gegenstandes berechtigt zu sein. Schließlich wird es von Interesse sein zu bestimmen, ob zusätzlich Mißsensemutationen des APC's zu familiärem Kolorektalkrebs in anderen Bevölkerungen beitragen könnten.

[0026] Die obige Offenbarung beschreibt im allgemeinen die vorliegende Erfindung. Ein vollständigeres Verstehen kann unter Einbeziehung der folgenden spezifischen Beispiele erreicht werden, welche hier lediglich zum Zwecke der Illustration gegeben sind, und nicht dafür vorgesehen sind, den Umfang der Erfindung zu limitieren.

#### BEISPIEL 1

[0027] Dieses Beispiel beschreibt die Entdeckung der I1307K Mißsensemutation im APC.

[0028] APC-Gentests an FAP-Patienten werden routinemäßig ausgeführt unter Verwendung des in vitro synthetisierten Proteinassays (IVSP). Dieser Test wird durch PCR-Amplifizieren eines DNA-Segmentes mit einem 5'-Primer ausgeführt, der Orte für T7-Transkription und Säugetier-Translation enthält.

[0029] Folgend auf die Transkription und Translation der PCR-Produkte werden die Polypeptide durch Elektrophorese getrennt. Im Laufe eines solchen Screens wurde ein 39 Jahre alter Patient mit multiplen Colorektaladenomas (CRA) gefunden, der ein trunkiertes Protein aufwies, von dem vorausgesagt wurde, daß es zwischen Codon 1099 und 1693 in Exon 15 liegt (**Fig. 1a**). Überraschenderweise ergab das Sequenzieren des relevanten Bereiches des APC's dieses Patienten keine trunkierenden Mutationen, sondern anstelle dessen wurde eine einzelne Veränderung, die aus einer T nach A Transversion bei Nukleotid 3920 bestand, gefunden. Diese Mutation resultierte in einem Austausch des Isoleucins für Lysin bei Codon 1307 in der APC-Region (Reste 1020–2075), die für das Binden an β-Catenin verantwortlich ist. Eine Vielzahl von Experimenten, einschließlich IVSP-Essays an klonierten PCR-Produkten zeigten, daß die Trunkierung ein in vitro Phänomen war, das durch die T nach A Substitutionsmutation verursacht wurde und daß keine trunkierten APC-Proteine in den Lymphozyten des Patienten gefunden wurden.

#### Verfahren

[0030] IVSP. IVSP wurde im wesentlichen ausgeführt, wie beschrieben in Powell et al. Die PCR-Produkte, die Codon **1307** enthielten, wurden mit den Primern 5' gga gga tcc tgt agg aat ggt atc tcg-3' und 5'-gga tcc taa tac gac tca cta tag gga gac cac cat ggt ttc tcc ata cag gtc acg g-3' (erhalten von DNAgency, Malvern, PA) amplifiziert. Sie wurden transkribiert und in vitro translatiert, unter Verwendung von Reagenzien, die von Promega (Madison, WI) erhältlich sind. Die PCR Produkte wurden auf gereinigt aus Agarosegelen und in den pZero-Vektor (Clontech, Palo Alto, CA) plonierte. Die Clone wurden unter Verwendung von Thermosequelinase (Amersham, Arlington Heights, IL) sequenziert. PCR-Produkte dieser Clone wurden dann als Templates für IVSP Reaktionen verwendet.

#### BEISPIEL 2

[0031] Dieses Beispiel demonstriert, daß die Trunkierung, die in Vitro beobachtet wurde, vermutlich in einer "Slippage" eines der Enzyme, die für IVSP am (A)<sub>8</sub> Bereich, der durch die Mutation gebildet wurde, verwendet wurden, begründet liegt.

[0032] Um zu bestimmen, ob die I1307K Mutation für das in dem IVSP Essay gefundene trunkierte Protein verantwortlich ist, wurden die PCR Produkte in *E. coli* kloniert. Clone, die entweder die Wildtyp Sequenz oder der mutierte Sequenz enthielten, wurden isoliert und für die IVSP Analyse verwendet. Die klonierte Mutantensequenz produziert sowohl das trunkierte Protein als auch das full-length Protein in einem Verhältnis von ungefähr 1 zu 3. Diese Resultate zeigen klar, daß eine Mißsense Mutation ein trunkiertes Protein produzieren

kann, wenn *in vitro* evaluiert wird.

[0033] Um zu bestimmen, ob ein trunkiertes Protein durch die I1307K Mutation *in vitro* produziert wurde, wurden Proteinextrakte aus den Lymphoblastoidzellen des Patienten unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen den Amino-Terminus des APCs gerichtet ist, immunoblottet; kein trunkiertes ABC Protein wurde gefunden. Um die Sensitivität des Immunoblottings zu erhöhen, verwendeten wir MAMA (Mono-Allele Mutationsanalyse). Die Lymphoblastoidzellen des Indexpatienten wurden mit Hamsterzellen fusioniert, und Hybride, die ein einzelnes humanes Chromoson 5 enthielten wurden isoliert. Dies ermöglichte es, die Genprodukte des I1307K Allels in der Awesenheit des Wildtypallels zu evaluieren; immer noch wurde nur full-length Protein gefunden (Daten nicht gezeigt).

[0034] Wir haben auch die Möglichkeit in Erwägung gezogen, daß der (A)<sub>8</sub> Bereich, der aus der I1307K Mutation (Fig. 1B) resultiert, möglicherweise eine instabile homopolymere Sequenz bildet, welche *in vivo* durch Polymerase "slippage" mutiert werden könnte. Dies würde einen frameshift durch eine Insertion oder Deletion eines A Restes innerhalb des (A)<sub>8</sub> – Bereiches verursachen. Um diese Hypothese zu testen wurde ein Paraffineingebetteter kolorektaler Tumor dieses Patienten mikroseziert, um neoplastische Zellen aus dem umgebenden normalen Gewebe zu isolieren. Auf gereinigte DNA aus diesen Zellen wurde verwendet, um den Bereich, der die Mutation enthält, zu amplifizieren. Keine Insertionen oder Deletionen in dem I1307K Bereich wurden gefunden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden andere Mikrosatelliten des Tumors des Patienten getestet (siehe Verfahren), und die Abwesenheit der Instabilität in diesen Sequenzen machte es unwahrscheinlich, daß dieser Patient HNPCC hatte.

#### Verfahren

[0035] Isolierung der DNA aus Paraffin-eingelegten Tumoren. DNA wurde aus Scheiben, die Paraffineingebettete kolorektale Adenoma des Indexpatienten enthielten isoliert, wie vorher beschrieben (Jen, NEJM, 1993). Um die Stabilität der (A)<sub>8</sub> Wiederholung, die die I1307K Mutation enthielt, zu bewerten, wurden die folgenden Primer verwendet: 5'-agc tga cct agt tcc aat c-3' und 5'-cag ctg aag atg aaa tag ga-3'. Um die Mikrosatellitinstabilität an anderen Orten zu evaluieren, wurden die Primer und Bedingungen verwendet, die in Liu et al, Nature Medicine, 1996, beschrieben sind.

[0036] MAMA. Lymphoblastoidzellen aus dem Index-Fall wurden mit Hamster UCW-56 Zellen unter Verwendung einer BTX Elektroporation fusioniert. Folgend auf die Auswahl zur Erhaltung des humanen Chromosoms 5 wurden die isolierten Clone ausgewählt und durch PCR hinsichtlich der I1307K Mutation (wie oben beschrieben) evaluiert, um zu bestimmen, welche der zwei Allelen beibehalten wurde. Clone, die jedes Allel enthielten, wurden für Immunoblotanalysen unter Verwendung von Antikörpern und Bedingungen, wie vorher beschrieben, verwendet.

#### BEISPIEL 3

[0037] Dieses Beispiel demonstriert die biologische Signifikanz der Mutation durch Untersuchung seines Auftretens in Populationen von Individuen.

[0038] Um die biologische Signifikanz dieser mutmaßlichen Mißsensemutation zu evaluieren wurden verschiedene Analysen ausgeführt. Zunächst wurde ein Allelspezifischer Oligonukleotid Hybridisierungssassay (ASO) entworfen, um die Populationshäufigkeit von I1307K zu bestimmen (siehe Verfahren). Da der Patient ein Mitglied einer teilweise ererbten Gruppe (Ashkenazi Juden) war, untersuchten wir sowohl nicht-Ashkenazis als auch Ashkenazi Bevölkerung. I1307K wurde in keinem der 243 Nicht-Ashkenazis, die getestet wurden gefunden, aber ein bemerkenswert hoher Anteil der Ashkenazis (6,1%) wurde gefunden, die Veränderung zu tragen (Tabelle 1). Der Unterschied in der I1307K Häufigkeit zwischen Ashkenazis und Nicht-Ashkenazis war sehr signifikant ( $p < 0,001$  durch  $\chi^2$  Test).

[0039] Um zu bestimmen, ob die I1307K Mutation in Verbindung mit CRC in der Ashkenazi Bevölkerung steht, untersuchten wir 212 Ashkenazis mit CRC. Unter Verwendung des ASOs wurde gefunden, daß 10,8 dieser Patienten, die I1307K Mutante enthielten. In jedem dieser Fälle wurde Sequenzierung verwendet, um die ASO Ergebnisse zu verifizieren. Diese erhöhte Häufigkeit war konsistent mit der Möglichkeit, daß das I1307K mit der CRC Predisposition in Verbindung steht, und der Unterschied zwischen Ashkenazis mit CRC und der generellen Ashkenazi Bevölkerung war statistisch signifikant ( $p < 0,02$  nach  $\chi^2$  Test). Um die Beziehung zwischen CRC und I1307K weiter zu ergründen, wurden die CRC Patienten gemäß Familiengeschichte getrennt. Vierzig der 212 Probanden hatten einen Verwandten ersten Grades mit kolorektaler Neoplasie (entweder Krebs oder Bening Tumor [Polyp]). In den verbleibenden 172 Probanden hatte entweder kein erstgradiger Verwandter kolorektale Neoplasien oder die Familiengeschichte war unbekannt ( $n = 172$ ). Zwanzig Prozent der Probanden der vierzig familiären Fälle trug die I1703K Mutation, eine Häufigkeit, die sehr signifikant war, wenn sie entweder zu den 6,1% verglichen wird, die in der allgemeinen Ashkenazi Bevölkerung gefunden wird, oder mit den 8,7% bei CRC Patienten ohne eine bekannte Familiengeschichte der CR Neoplasia (Tabelle 1).

Tabelle 1:

Serie	I1307K	Gesamt	%
+			
<b>Normale Kontrollen</b>			
Nicht-Ashkenazi	0	243	0%
Ashkenzai	47	766	6,1%
<b>Ashkenazi Kolorektal</b>			
<b>Krebspatienten</b>			
Gesamt	23	212	10,8%
Mit Familiengeschichte von	8	40	20,0%
CR Neoplasia			
Ohne bekannte Geschichte von	15	172	8,7%
CR Neoplasia			

[0040]

a vs. b, p < 0.0001 by  $\chi^2$ b vs c, p < 0.02 by  $\chi^2$ b vs. d, p < 0.01 by  $\chi^2$ e vs. e, p < 0.05 by  $\chi^2$ 

## Verfahren

[0041] Patientenauswahl. Zufällig ausgewählte Ashkenazis wurden aus einer Gruppe genommen, die sich Tests für Tay-Sachs Krankheiten unterzogen, wurden als Kontroll-Ashkenazigruppe verwendet. Nicht-Ashkenazis bestanden aus einer weiteren zufällig ausgewählten Gruppe von Nichtjüdischen Individuen, welche Blutproben aus verschiedenen Gründen beigesteuert hatten. Zwei Gruppen von Ashkenazi-Kolorektal-Krebspatienten wurden analysiert. Eine Gruppe repräsentierte eine abfolgende Serie von Individuen, welche wegen ihres Kolorektalkrebses am Memorial Sloan-Kettering behandelt wurden. Die zweite bestand aus einer Gruppe aus Individuen, welche hinsichtlich CRC am Johns Hopkins Hospital evaluiert wurden. Diese zweite Gruppe war keine abfolgende Serie und war stark unausgewogen in Richtung von Patienten mit einer Familiengeschichte an CRC.

[0042] Mutationsanalysen. Genomische DNA wurde als Template für die PCR mit den folgenden Primern verwendet: 5'-gatgaaataggatgtaatcagacg und 5'-cttcgctcacaggatcttcagc. Das PCR Produkt wurde auf Nylonfilter slot-geblottet und mit Oligonukleotiden hybridisiert, die dem Wildtyp oder der Mutanten-Sequenz am Kodon 1307 entsprachen (5'-aatagcagaaaataaaagaaaat oder 5'-aaatagcagaaaaaaaagaaaat). Hybridisierungen

wurden bei Raumtemperatur eine Stunde lang ausgeführt, dann wurde 30 Minuten in 2xSSC, 0,1%SDS bei Raumtemperatur gewaschen, gefolgt durch eine Zwei-Minuten Waschung bei 56°C in 2xSSC, 0,1% SDS. Um die Blottingergebnisse zu bestätigen, wurden die PCR Produkte, die Mutationen aufzeigten, mit Thereto-Sequenase sequenziert, unter Verwendung des folgenden Primers: 5'-gatgaaataggatgtaatcagacg. In zwei Patienten mit der I1307K Mutation wurden PCR Produkte, die die gesamte kodierende Region des APCs umfassen, aus DNA oder cDNA wie vorher beschrieben erhalten, und direkt sequenziert.

#### BEISPIEL 4

[0043] Dieses Beispiel demonstriert einen zusätzlichen Test der Beziehung zwischen I1307K Mutation und der Krankheit.

[0044] Wir untersuchten seine Trennung in Krebsfamilien. Wir waren in der Lage, acht Familien zu identifizieren, in welchen wenigstens zwei erstgradige Verwandte kolorektale Neoplasia (Krebs oder Polypen) hatten, und in welchen der Proband die I1307K Veränderung trug. Elf Verwandte, die von CRC oder CRA betroffen waren, wurden unter Verwendung von ASO untersucht, und zehn wurden gefunden, die I1307K Mutante (**Fig. 2**) zu tragen; jeweils wurde durch Sequenzieren bestätigt. Dieses Ergebnis liegt sehr unwahrscheinlich nur im Zufall begründet ( $p < 0.01$ , Bayesianische Wahrscheinlichkeit).

[0045] Auch diese Daten suggerierten nachdrücklich, daß die I1307K Mutation intrinsisch zur CRC Prädisposition in Beziehung steht, es verblieb möglich, daß diese Mutation in einem Verbindungsungleichgewicht mit einer anderen Mutation im APC liegt. Um diese Möglichkeit auszugrenzen wurde die "hot-spot" Region des APCs in zwei Individuen mit familiärem CRC und der E307K Mutation sequenziert. Nur ein voridentifizierter stummer Polymorphismus wurde gefunden, was es unwahrscheinlich macht, daß eine andere ABC Mutation in der sequenzierten Region mit der Krankheit mendelt.

#### Referenzen

1. Kinzler, et al., Cell 87 : 159–170 (1996)
2. Groden, et al., Cell 66 : 589–600 (1991)
3. Nishisho, et al., Science 253 : 665–669 (1991)
4. Leach, et al., Cell 75 : 1215–1225 (1993)
5. Liu, et al., Nature Medicine 2 : 169–174 (1996)
6. Fishel, et al., Cell 75 : 1027–1038 (1993)
7. Papadopoulos et al., Science 263 : 625–1629 (1994)
8. Nicolaides et al., Nature 371 : 75–80 (1994)
9. Powell, et al., New England Journal of Medicine 329(27): 1982–1987 (1993)
10. Rubinfeld et al., Science 262 : 1731–1734 (1993)
11. Su et al., Science 262 : 1734–1737 (1993)
12. Morin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 7950–7954 (1996)
13. Friedl et al., Hum. Genet. 97 : 579–584 (1996)
14. Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 2846–2850 (1993)
15. Papadopoulos et al., Nature Genetics 11 : 99–102 (1995)
16. Thibodeau, et al., Science 260 : 816–819 (1993)
17. Parsons et al., Cancer Research 55 : 5548–5550 (1995)
18. Aaltonen, et al., Science 260 : 812–816 (1993)

#### Patentansprüche

1. Eine Allelen-spezifische Nukleinsäuresonde, die die Nukleinsäuresequenz einer Region einer humangen APC – Mutante oder deren Ribonukleotidäquivalent umfaßt, wobei diese Region eine T nach A-Transversion bei Nukleotid 3920 enthält.
2. Ein Verfahren zum Bestimmen der Gegenwart einer Mutation im APC in einem Probanden, welcher mit einer Familiengeschichte des kolorektalen Krebses unter Ashkenazi-Juden in Verbindung steht, wobei das Verfahren die Schritte des Bestimmens der Gegenwart einer T nach A-Transversionsmutation bei Nukleotid 3920 in einem APC-Gen eines Probanden umfaßt.
3. Das Verfahren nach Anspruch 2, wobei eine Allelenspezifische Nukleinsäuresonde zu einer Nukleinsäure hybridisiert wird, welche aus einem Probanden isoliert wurde, oder zu einer Nukleinsäure, die von einem Probanden kloniert oder aus ihm amplifiziert wurde, wobei die Sonde die Nukleinsäuresequenz einer Region einer humanen APC – Mutante oder deren Ribonukleotidäquivalent umfaßt, wobei die Region eine T nach

A-Transversion bei Nukleotid 3920 enthält.

4. Das Verfahren nach Anspruch 2, wobei eine Region eines APC-Gens, welches Codon 1307 umfaßt, amplifiziert oder kloniert wird und die Region einer Nukleotidsequenzierung ausgesetzt wird.

5. Ein Verfahren für das Bestimmen der Gegenwart einer Mutation im APC eines Probanden, welcher mit einer Familiengeschichte des kolorektalen Krebses unter Ashkenazi-Juden in Verbindung steht, wobei das Verfahren die Schritte des Bestimmens der Gegenwart eines Lysins bei Aminosäure 1307 des APC-Proteins des Probanden umfaßt.

6. Das Verfahren nach Anspruch 5, wobei ein Antikörper, der spezifisch an ein APC-Epitop bindet, welches die I1307K-Mutation umfaßt, mit einer APC-Proteinenthaltenden Probe des Probanden in Kontakt gebracht wird.

7. Das Verfahren nach Anspruch 5, wobei ein APC-Protein, das aus dem Probanden isoliert wurde oder unter Verwendung einer APC-Nukleinsäure, die von dem Probanden isoliert wurde, hergestellt wurde, einer Aminosäuresequenzierung ausgesetzt wird.

8. Ein Verfahren zum Bestimmen der Gegenwart einer Mutation im APC in einem Probanden, welcher mit einer Familiengeschichte des kolorektalen Krebses unter Ashkenazi-Juden in Verbindung steht, wobei das Verfahren die Schritte des Bestimmens der Gegenwart eines Lysincodons bei Codon 1307 eines APC-Gens des Probanden umfaßt.

9. Das Verfahren nach Anspruch 8, wobei ein Allelespezifischer Nukleinsäurefühler zu einer Nukleinsäure, die aus dem Probanden isoliert wurde, oder zu einer Nukleinsäure, die aus dem Probanden amplifiziert oder kloniert wurde, hybridisiert wird, wobei der Fühler die Nukleinsäuresequenz einer Region einer humanen APC – Mutante oder deren Ribonukleotidäquivalents umfaßt, wobei die Region eine T nach A-Transversion bei Nukleotid 3920 umfaßt.

10. Das Verfahren nach Anspruch 8, wobei eine Region eines APC-Gens, welches Codon 1307 umfaßt, amplifiziert oder kloniert wird und die Region einer Nukleinsäuresequenzierung ausgesetzt wird.

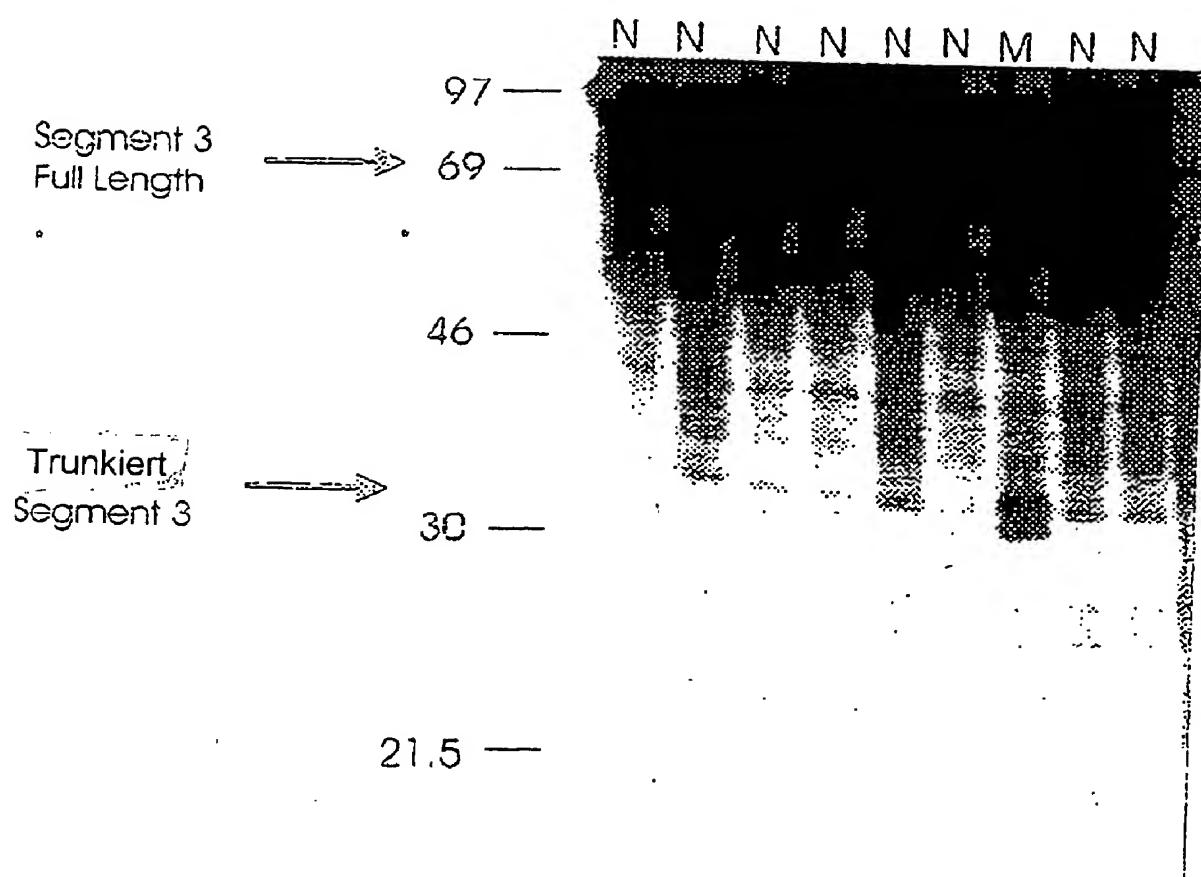
11. Ein Kit zum Detektieren einer Mutation im APC, welches Träger des kolorektalen Krebses prädisponiert, umfassend:

ein Paar Oligonukleotidprimer zum Amplifizieren von wenigstens einem Teil des APC-Exons 15, welches Nukleotid 3920 umfaßt; und

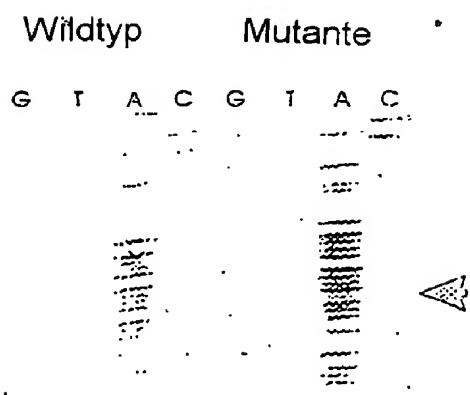
eine Allelen-spezifische Sonde, welche die Nukleinsäuresequenz einer Region einer humanen APC – Mutante oder dessen Ribonukleotidäquivalents umfaßt, wobei die Region eine T nach A-Transversion bei Nukleotid 3920 enthält.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



四  
二

